Elucigene® CF-EU2v1 Gebrauchsanweisung

Best.-Nr.: **CF2EUB2 –** 50 Tests
CF2EUBX – 10 Tests

IVD Für die In-vitro-Diagnostik

Hergestellt von Elucigene Diagnostics.
Elucigene Diagnostics
Greenheys House
Pencroft Way
Manchester Science Park
Manchester
M15 6JJ

Vertrieb, Kundendienst und Technischer Kundendienst:
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

CE

Elucigene Diagnostics is the trading name of Delta Diagnostics (UK) Limited., a company registered in England and Wales, registration number 8696299.

Elucigene CF-EU2v1

Verwendungszweck

Für den gleichzeitigen qualitativen in-vitro-Nachweis der folgenden CFTR-Genmutationen (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) im Menschen in DNA, die aus Vollblut- (EDTA-konserviert) und Trockenblutproben extrahiert wurde:

Herkömmlich	Nach den HGVS Richtlinien*	
	cDNA name	Protein name
CFTRdele2,3	c.54-5940_273+1025del (c.54-5940_273+10250del21080)	
E60X	c.178G>T	p.Glu60X
P67L	c.200C>T	p.Pro67Leu
G85E	c.254G>A	p.Gly85Glu
394delTT	c.262_263del (c.262_263delTT)	p.Leu88IlefsX22
444delA	c.313del (c.313delA)	p.Ile105SerfsX2
R117C	c.349C>T	p.Arg117Cys
R117H	c.350G>A	p.Arg117His
Y122X	c.366T>A	p.Tyr122X
621+1G>T	c.489+1G>T	
711+1G>T	c.579+1G>T	
L206W	c.617T>G	p.Leu206Trp
1078delT	c.948del(c.948delT)	p.Phe316LeufsX12
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp
R347P	c.1040G>C	p.Arg347Pro
R347H	c.1040G>A	p.Arg347His
A455E	c.1364C>A	p.Ala455Glu
I507del	c.1519_1521del (c.1519_1521delATC)	p.Ile507del
F508del	c.1521_1523del (c.1521_1523delCTT)	p.Phe508del
1677delTA	c.1545_1546del (c.1545_1546delTA)	p.Tyr515X
V520F	c.1558G>T	p.Val 520Phe
1717-1G>A	c.1585-1G>A	
G542X	c.1624G>T	p.Gly542X
S549R(T>G)	c.1647T>G	p.Ser549Arg
S549N	c.1646G>A	p.Ser549Asn
G551D	c.1652G>A	p.Gly551Asp
R553X	c.1657C>T	p.Arg553X
R560T	c.1679G>C	p.Arg560Thr
1811+1.6kbA>G	c.1680-886A>G	
1898+1G>A	c.1766+1G>A	
2143delT	c.2012del (c.2012delT)	p.Leu671X
2184delA	c.2052del (c.2052delA)	p.Lys684AsnfsX38
2347delG	c.2215del (c.2215delG)	p.Val739TyrfsX16
W846X	c.2538G>A	p.Trp846X
2789+5G>A	c.2657+5G>A	
Q890X	c.2668C>T	p.Gln890X
3120+1G>A	c.2988+1G>A	

Herkömmlich	Nach den HGVS Richtlinien*	
	cDNA name	Protein name
3272-26A>G	c. 3140-26A>G	
R1066C	c.3196C>T	p.Arg1066Cys
Y1092X(C>A)	c.3276C>A	p.Tyr1092X
M1101K	c.3302T>A	p.Met1101Lys
D1152H	c.3454G>C	p.Asp1152His
R1158X	c.3472C>T	p.Arg1158X
R1162X	c.3484C>T	p.Arg1162X
3659delC	c.3528del (c.3528delC)	p.Lys1177SerfsX15
3849+10kbC>T	c.3718-2477C>T	
S1251N	c.3752G>A	p.Ser1251Asn
3905insT	c.3773dup (c.3773dupT)	p.Leu1258PhefsX7
W1282X	c.3846G>A	p.Trp1282X
N1303K	c.3909C>G	p.Asn1303Lys

* *with reference to – Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme. Berwouts S, Morris M, Girodon G, Schwarz M, Stuhrmann M and Dequeker E. Human Mutation, Vol.00, No. 0, 1-7 (2011)*

CF-EU2v1 kann zwischen Personen unterscheiden, die für alle oben aufgeführten Mutationen und Varianten mit Ausnahme von S549R(T>G) heterozygot bzw. homozygot sind. Siehe Abschnitt „Kreuzreaktivität“ in diesem Dokument.

Zusammenfassung und Erläuterung

Zystische Fibrose (CF; Mukoviszidose) ist die häufigste lebensbegrenzende autosomal-rezessive Störung in der weißen Bevölkerung. Die Inzidenz dieser Krankheit liegt unter Weißen bei 1:3200 Lebendgeburten (1). In der weißen Bevölkerung beträgt die heterozygote Häufigkeit ca. 1:25.

Zystische Fibrose befällt das Epithelgewebe in mehreren Organen und führt zu einer komplexen Multisystemerkrankung, die die exokrine Bauchspeicheldrüse, den Darm, die Atemwege, den männlichen Genitaltrakt, das Leber-Gallen-System und die exokrinen Schweißdrüsen in Mitleidenschaft zieht. Der Ausdruck der Krankheit variiert nach Schwere der *CFTR*-Mutationen (2), genetischen Modifikatoren (3) und Umweltfaktoren (4). Die Bandbreite erstreckt sich vom Tod in früher Kindheit infolge einer progressiven obstruktiven Lungenerkrankung mit Bronchiektasie über Bauchspeicheldrüseninsuffizienz mit allmählich fortschreitender obstruktiver Lungenerkrankung während der Adoleszenz und einer erhöhten Frequenz von Krankenhausaufenthalten aufgrund der Lungenerkrankung im frühen Erwachsenenalter bis zu rezidivierender Sinusitis und Bronchitis oder Unfruchtbarkeit beim Mann im jungen Erwachsenenalter.

Am häufigsten wird die Diagnose einer zystischen Fibrose bei Personen mit einem oder mehreren charakteristischen phänotypischen Merkmalen einer CF plus dem Nachweis einer Anomalie in der CFTR-Funktion auf Grundlage einer der folgenden Ursachen gestellt: Vorliegen zweier krankheitsverursachender Mutationen im CFTR-Gen oder zweier anomaler quantitativer Schweißchloridwerte bei der Pilocarpin-Iontophorese (>60 mEq/l) oder transepitheliale Messungen der nasalen Potenzialdifferenz (NPD) mit für CF charakteristischem Ergebnis. Die Nachweisquote für CFTR-Mutationen variiert nach Testmethode und ethnischem Hintergrund. Bei einigen symptomatischen Personen ist nur eine oder keine einzige krankheitsverursachende Mutation nachweisbar; bei manchen Trägern ist die krankheitsverursachende Mutation nicht nachweisbar.

CFTR-bezogene Störungen werden autosomal-rezessiv vererbt. Bei Geschwistern einer Person mit zystischer Fibrose liegt die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bei 25%, die Wahrscheinlichkeit, asymptomatischer Träger zu sein, bei 50% und die Wahrscheinlichkeit, nicht zu erkranken und kein Träger zu sein, bei 25%. Molekulargenetische Tests auf eine oder mehrere krankheitsverursachende Mutationen im CFTR-Gen werden zur Detektion von Trägern im Rahmen von Screening-Programmen in der Bevölkerung verwendet. Pränatale Tests sind für Schwangerschaften mit erhöhtem Risiko von CFTR-bedingten Störungen verfügbar, wenn die krankheitsverursachenden Mutationen bereits in der Familie vorgekommen sind.

Seit der Entdeckung des CFTR-Gens 1989 (5) wurden über 1700 Mutationen und Varianten im Gen beschrieben (6). Viele dieser Mutationen sind „privat“, d.h. sie wurden bisher nur bei einem Patienten und/oder einer Familie beschrieben. Routinetests auf alle möglichen Mutationen sind weder machbar noch rentabel und so beschränken sich die Tests auf die häufigsten Mutationen. CF-EU2v1 ist ein Testkit für zystische Fibrose, das speziell auf die häufigsten Mutationen in Populationen europäischen Ursprungs ausgerichtet ist. Der Assay erkennt insgesamt 50 Mutationen und analysiert außerdem den Poly-T-Trakt des Intron 9 mit einer exakten Messung der benachbarten TG-Wiederholung.

Der polymorphe Thymidintrakt beim Übergang von Intron 9 auf Exon 10 beeinflusst die Transkription. Die Anzahl der Thymidinreste (5T, 7T oder 9T) hat Einfluss auf die Effizienz beim Splicen von Exon 10; bei einem 5T-Allel fehlt ein Teil der Exon-10-Transkripte, was zu einem funktionslosen Protein und variablen CF-Symptomen führt. Berichten zufolge kann die Anzahl an TG-Wiederholungen 5’ am Polythymidintrakt auch das Splicen von Exon 10 beeinflussen (7). Bei Vorhandensein auf demselben Allel wie die 5T-Variante fehlt bei einem größeren Teil der CFTR-Transkripte das Exon 10, je länger die Anzahl der TG-Wiederholungen ist. Die Anzahl der TG-Wiederholungen kann mithilfe von CF-EU2v1 durch eine Größenbestimmung der 5T-Amplikonpeaks bestimmt werden.

Testprinzipien

Die Methode des Elucigene CF-EU2v1 Kit basiert auf der fluoreszierenden allelenspezifischen Amplifikationstechnologie ARMS (Amplification Refractory Mutation System), mit der Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in der DNA nachgewiesen werden können (8). Das Prinzip des ARMS beruht darauf, dass Oligonukleotide mit einer 3’-Fehlpaarung unter speziellen Bedingungen nicht als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) funktionieren. Die Auswahl entsprechender Oligonukleotide ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis von spezifischen mutierten oder normalen DNA-Sequenzen. Amplifizierte Sequenzen (Amplikons) werden mittels Kapillarelektrophorese auf einem Gen-Analysator von Applied Biosystems separiert. Die Analysesoftware erlaubt die Identifikation und Markierung der Amplikons nach ihrer Größe und Einfärbung.

Elucigene CF-EU2v1 ist ein hoch multiplexer Assay, der aus zwei PCR-Reaktionen (A und B) besteht. Fünfzig Mutationssequenzen innerhalb des CFTR-Gens werden im A-Gemisch nachgewiesen und als blaue Amplikon-Peaks dargestellt. Die entsprechenden nicht mutierten Normalsequenzen (Wildtyp-Sequenzen) werden im B-Gemisch nachgewiesen und als grüne Amplikon-Peaks dargestellt. Das A-Gemisch weist außerdem die Normalsequenz der am häufigsten beobachteten Mutation nach, die bei Weißen zystische Fibrose auslöst, der sogenannten F508del-Mutation. Diese wird als grüner Amplikon-Peak dargestellt. Darüber hinaus werden Poly-T-Wiederholungssequenzen im A-Gemisch nachgewiesen und als schwarze Amplikon-Peaks dargestellt. Sowohl A- als auch B-Gemisch enthalten (nicht für zystische Fibrose spezifische) interne Amplifikationskontrollmarker, um die wirksame Probenamplifikation zu überwachen. Diese werden als rote Amplikon-Peaks dargestellt.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Die in diesem Kit enthaltene DNA-Kontrolle ist menschlicher Herkunft und hat sich in unabhängigen Tests auf PCR-Basis als negativ auf Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV) und das Humane Immundefizienzvirus 1 (HIV1) erwiesen.
2. Bei der Arbeit mit Humanmaterial vorsichtig vorgehen. Alle Proben sind als potenziell infektiös zu betrachten. Keine Testmethode kann das Vorhandensein von HBV, HCV, HIV 1 oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen.
3. Die Handhabung der Proben und Testkomponenten, sowie deren Gebrauch, Lagerung und Entsorgung muss gemäß der durch nationale Richtlinien und Verordnungen definierten Verfahren für infektiöses Material erfolgen.
4. Im Einklang mit der aktuellen guten Laborpraxis sollten Labore eigene interne Qualitätskontrollproben bekannten Genotyps in jedem Assay mitführen, damit die Validität des Verfahrens beurteilt werden kann.
5. Bei Schäden an der Kitverpackung kann auch der Inhalt beschädigt sein. Das Kit nicht verwenden und den Kundendienst verständigen.

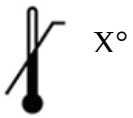
Bei der Beschriftung verwendete Symbole

Die verwendeten Symbole auf allen Etiketten und Verpackungen entsprechen dem harmonisierten Standard ISO15223

Hersteller

Anzahl der Tests

Gebrauchsanweisung beachten



Unterhalb der angegebenen Temperatur lagern

Nicht mehr nach dem angegebenen Datum verwenden

Bestellnummer

Los- oder Chargennummer

In-vitro-Diagnostikum

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Die Reagenzien sollten in einer Umgebung, die frei von kontaminierenden DNA- und PCR-Produkten ist, aufbewahrt werden.

Alle Reagenzien werden in gebrauchsfertigem Zustand geliefert. Verschlossene und geöffnete Reagenzien bei -20 °C lagern. Geöffnete Reagenzien können bis zu 3 Monate aufbewahrt werden.

Das mitgelieferte Material reicht für 50 (10) Tests aus:

2 Fläschchen mit je 120µl (50µl) CF-EU2v1 Primergemisch A mit Primern zur Amplifikation der folgenden mutierten Allele: R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X und R1158X. Dieses Gemisch enthält außerdem Wildtyp-Primer für den Nachweis des normalen F508del-Allels, Primer für den Nachweis der Polythymidinvarianten IVS8-5T, IVS8-7T und IVS8-9T und Primer für die Identifikation zweier hypervariabler Short-Tandem-Repeat- (STR-) Marker – 404473 (450043).

2 Fläschchen mit je 120µl (50µl) CF-EU2v1 Primergemisch B mit Wildtyp-Primern zur Amplifikation der normalen Allele der vom Primergemisch A amplifizierten Mutationen mit Ausnahme von F508del, dem normalen Allel, das von im Primergemisch A enthaltenen Primern amplifiziert wird. Dieses Gemisch enthält außerdem Primer zur Identifikation zweier hypervariabler STR-Marker – 404474 (450044).

2 Fläschchen mit je 400µl (75µl) PCR-Mastermix mit HotStart Taq DNA-Polymerase und Desoxynukleotidtriphosphaten in Puffer – 404480 (450045).

1 Fläschchen (50 µl) Kontroll-DNA mit einer Konzentration von 6 ng/µl, normal für die von Elucigene CF-EU2v1 nachgewiesenen Mutationen – 404489.

Erforderliche Materialien (nicht im Kit enthalten)

Labor-Verbrauchsmaterial – Handschuhe; Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss; PCR-Gefäße von 0,2 ml bzw. vom Hersteller des Thermocyclers empfohlene Mikrotiterplatten; Pipettenspitzen.

DNA-Isolierung – QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Best.-Nr. 51304/51306) oder gleichwertig.

Kapillarelektrophorese – GeneScan 600 LIZ Größenstandard (ABI Best.-Nr. 4366589), GeneScan 600v2 LIZ Größenstandard (ABI Best.-Nr. 4408399), Multikapillar-Matrixstandard DS-33 (Farbstoffset G5) (ABI Best.-Nr. 4345833), POP-7 Polymer (ABI Best.-Nr. 4352759), 10x Puffer für Gen-Analysator (ABI Best.-Nr. 402824) und Hi-Di Formamid (ABI Best.-Nr. 4311320).

Hinweis: Sicherstellen, dass alle verwendeten Materialien das vom jeweiligen Hersteller angegebene Stabilitätsdatum noch nicht überschritten haben.

Erforderliche Ausrüstung

Laborausstattung – Präzisionspipetten (2 Sätze: je 1 für Prä- und Postamplifikationsbereich); Schutzkleidung; Vortex-Mischer; Mikrozentrifuge; Zentrifuge für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.

PCR-Amplifikation - Thermocycler für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen oder 0,2-ml-Fläschchen mit einer Temperaturgenauigkeit von mindestens +/-1 °C im Bereich von 33 °C bis 100 °C und einer statischen Gleichförmigkeit der Temperatur von +/-1 °C.

Hinweis: Der Thermocycler muss regelmäßig gemäß den Anweisungen des jeweiligen Herstellers gewartet und kalibriert werden, um die genaue Einhaltung des PCR-Zyklus und optimale Leistungsfähigkeit zu gewährleisten. Der Elucigene CF-EU2v1 Assay wurde auf Thermocyclern des Modells 9700 von Applied Biosystems entwickelt. Andere Modelle bzw. Geräte anderer Hersteller müssen umfassend auf optimale Leistungsfähigkeit getestet und evaluiert werden, bevor Ergebnisse mit dem CF-EU2v1 gemeldet werden.

Kapillarelektrophorese – ABI 3130/3500 Gen-Analysator (mit GeneMapper Fragmentanalyse-Software), 36 cm oder 50 cm (ABI3500) Kapillararray, optische Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, Abdeckungen für 96 Vertiefungen, Cassetten für 96 Vertiefungen.

Hinweis: Die für die Kapillarelektrophorese verwendeten Geräte müssen regelmäßig gemäß den Anweisungen des jeweiligen Herstellers gewartet und kalibriert werden, um die optimale Leistungsfähigkeit zu gewährleisten.

Entnahme und Lagerung der Proben

Vollblut- (EDTA-konserviert) und Trockenblutproben wurden evaluiert und sind mit diesem Test kompatibel.

Wie gelegentlich beobachtet, können sich Probenentnahmehilfen nachteilig auf die Unversehrtheit bestimmter Analyte auswirken und einige Verfahrenstechnologien beeinträchtigen (9). Es wird daher jedem Anwender empfohlen sicherzustellen, dass das gewählte Instrument gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wird und dass Probenentnahmehilfen mit diesem Test kompatibel sind.

Blutproben sollten vor der DNA-Präparation bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

DNA-Isolierung aus Vollblutproben (EDTA)

Einheitliche Ergebnisse werden erzielt, wenn die DNA mithilfe des QIAamp 96 DNA Blood Kit (oder des QIAamp DNA Mini Kit mit Proteinase K) nach dem im QIAamp-Handbuch beschriebenen Protokoll extrahiert wird. Dabei wird mit 200 µl flüssigem Vollblut begonnen und in 200 µl molekularbiologisch reinstem Wasser eluiert.

DNA-Isolierung aus Trockenblutproben

Einheitliche Ergebnisse werden erzielt, wenn die DNA mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit nach dem im QIAamp-Handbuch beschriebenen Protokoll extrahiert wird. Hier wird allerdings mit 2 x 3 mm großen Plättchen aus Trockenblut beginnen und in 100 µl molekularbiologisch reinstem Wasser eluiert.
Es wird empfohlen, alternative DNA-Extraktionsverfahren und Probentypen auf die Verwendung mit dem Elucigene CF-EU2v1-Test gründlich zu prüfen, bevor die Ergebnisse für diagnostische Zwecke genutzt werden.

Wichtige Gesichtspunkte - DNA-Einsatz
Unter optimalen PCR-Bedingungen und unter Verwendung der empfohlenen Einstellungen für die Probeninjektion (siehe Hinweis im Abschnitt „Kapillarelektrophorese“) in den Kapillarsäulen-Durchlaufmodulen sind routinemäßig akzeptable Ergebnisse mit DNA erzielt worden, die mithilfe der oben genannten Verfahren bei Konzentrationen zwischen 1,5 ng/µl und 25 ng/µl extrahiert wurde. Die Quantifizierung der DNA ist sehr wichtig. Daher sollte die Konzentration aller zu testenden DNA-Proben gemessen werden, um optimale Ergebnisse zu gewährleisten. Akzeptable Methoden sind z. B. PicoGreen-Fluoreszenz oder UV-Absorbanz. Wegen der Unterschiede zwischen den Methoden zur DNA-Quantifizierung sollte der Anwender folgende Hinweise beachten:

Bei einem sehr hohen DNA-Einsatz ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Analysesoftware Hintergrund-Peaks markiert. Die folgenden Maßnahmen können ergriffen werden, um diese Wahrscheinlichkeit zu senken.

- DNA-Probe verdünnen und erneut amplifizieren
- Injektionszeit senken – siehe Abschnitt „Kapillarelektrophorese“
- Einen höheren Peak-Amplituden-Schwellenwert wählen – siehe Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Analysesoftware

Bei einem niedrigen DNA-Einsatz ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die diagnostischen Peaks schwach sind und nicht von der Analysesoftware markiert werden. Die folgenden Maßnahmen können ergriffen werden, um ein stärkeres Signal zu erhalten.

- Injektionszeit auf 36 Sekunden erhöhen (dringend empfohlen bei Extraktion aus Trockenblut) – siehe Abschnitt „Kapillarelektrophorese“
- Trockenblutprobe erneut extrahieren und in weniger Wasser (50 µl) eluieren
- Die Anzahl der Trockenblutproben für die Extraktion auf 4 x 3 mm Scheiben steigern

Wichtige Gesichtspunkte – DNA-Qualität

CF-EU2v1 ist ein hoch multiplexer Assay und setzt für die optimale Funktion eine effiziente PCR-Amplifikation voraus. Die DNA-Qualität kann entscheidend für die Effizienz des PCR-Vorgangs sein. Zusammen mit der DNA-Probe extrahierte Hemmsubstanzen können zu einer suboptimalen Amplifikation und dadurch zu schwachen und schlecht ausgewogenen Peaks führen. Elucigene Diagnostics hat die Verwendung des QIAamp 96 DNA Blood Kit und des QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH) zusammen mit dem CF-EU2v1 Kit validiert. Andere Kits bzw. Methoden zur DNA-Extraktion sollten zur Verwendung mit dem CF-EU2v1 validiert und optimiert werden.

Hinweis: *Weitere Informationen gehen aus dem Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Fehlersuche hervor.*

Testdurchführung

Eindämmung der PCR-Kontamination

Der PCR-Vorgang erzeugt eine große Anzahl amplifizierter Produkte (Amplikons) und ist mit einem hohen Kontaminationsrisiko verbunden, was zu falschen Ergebnissen führen kann. Kontaminationen können aus zwei Quellen stammen:

Kreuzkontamination – Kontamination der Probe mit nicht amplifiziertem Material aus der Umgebung oder aus anderen Proben, die die Zielsequenz enthalten.

Kontamination durch Endprodukte – Kontamination der Probe mit Amplikons aus früheren PCRs mit dem Ergebnis, dass sowohl die Zielsequenz als auch die kontaminierenden Amplikons verstärkt werden.

Labors, an denen PCR durchgeführt wird, sollten sich dieser Kontaminationsquellen bewusst sein und entsprechende Vorgehensweisen beachten, die das Kontaminationsrisiko signifikant senken. Methoden zur Eindämmung von Kontaminationen sind eingehend beschrieben worden (10) und umfassen die physische Anordnung des Labors, den Arbeitsfluss, die Vorgehensweisen beim Umgang mit Proben sowie chemische und enzymbasierte Ansätze. Eine genau definierte, gute Laborpraxis ist entscheidend für die Eindämmung von PCR-Kontaminationen und ist vor dem Testen von klinischen Proben umzusetzen.

Amplifikationsverfahren

Hinweis: *Um die Gefahr einer Kontamination so gering wie möglich zu halten, müssen die Schritte 3-5 in einem PCR-Produkt-freien Bereich (vorzugsweise einer Sicherheitswerkbank) durchgeführt werden.*

1. *Den Thermocycler auf eine 20-minütigen, aus einem Schritt bei 94 °C bestehenden Zyklus zur Aktivierung von HotStart Taq in Verbindung mit einem Amplifikationszyklus-Programm (30 Zyklen) von 1 Minute bei 94 °C (Denaturierung), 2 Minute bei 58 °C (Annealing) und 1 Minute bei 72 °C (Extension) programmieren. Zusätzlich muss eine 20-minütige Verlängerung der Extension bei 72 °C im letzten Zyklus eingegeben werden.*
2. *Bei jedem PCR-Durchlauf muss eine negative Kontrolle mitlaufen.*
3. *Die Primergemische und den PCR-Mastermix auftauen und kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt am Boden der Fläschchen sammelt. Vorsichtig im Vortex-Mischer durchmischen und die Fläschchen erneut kurz zentrifugieren. Eine für die Anzahl der zu testenden Proben und Kontrollen ausreichende Menge Reaktionsgemisch zubereiten (Tabelle 1).*

   Hinweis: Der PCR-Mastermix ist viskos. Es ist darauf zu achten, dass das korrekte Volumen eingesetzt wird. Es wird empfohlen, den PCR-Mastermix zu den zuvor dispensierten Primergemischen zu geben, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit restlos aus der Pipette in das Primergemisch abgegeben wird.

   Hinweis: Gemische oder Komponenten aus verschiedenen Chargen des CF-EU2v1 Kits dürfen nicht zusammen verwendet werden.

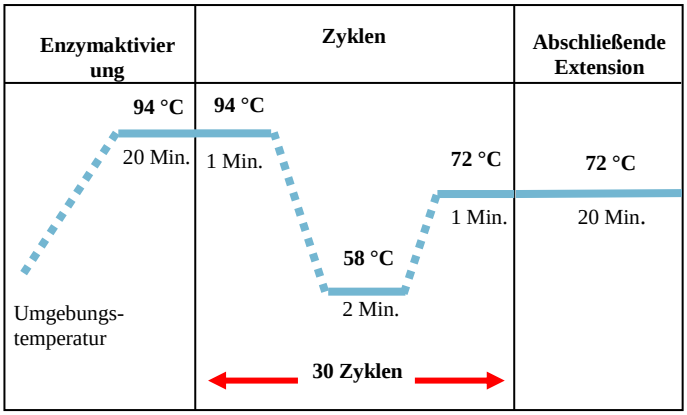


Tabelle 1: Rezeptur Reaktionsgemisch

	Anzahl der zu testenden Proben			
	1	10	25	50
Primergemisch (µl)	4,5	45	112,5	225
PCR-Mastermix (µl)	7,5	75	187,5	375
Insgesamt (µl)	12	120	300	600

4. *Jeweils 10 µl Reaktionsgemisch in den Boden des entsprechend beschrifteten 0,2-ml-PCR-Röhrchens bzw. der Vertiefung pipettieren.*
5. *Mit neuen Pipettenspitzen jeweils 2,5 µl der zu testenden DNA-Probe in jedes Röhrchen pipettieren und die Röhrchen verschließen. Keine DNA-Probe in das Röhrchen für die Negativkontrolle geben, sondern stattdessen 2,5 µl steriles entionisiertes Wasser verwenden.*
6. *Die PCR-Röhrchen kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt am Boden der Röhrchen sammelt.*
7. *Die Röhrchen fest in den Block des Thermocyclers einsetzen. Den aus einem Schritt bei 94 °C bestehenden Zyklus sowie das anschließende Amplifikationszyklus-Programm starten.*
8. *Nach Abschluss des Amplifikationszyklus-Programms können die Proben entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder bis zu 7 Tage lang bei 2-8 °C gelagert werden, bevor die Kapillarelektrophorese durchgeführt wird.*

Kapillarelektrophorese

Jedem Anwender wird empfohlen,die gewählte Kapillarelektrophoreseausrüstung entsprechend der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers zu bedienen und sich davon zu überzeugen, dass sie mit diesem Test kompatibel ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere das Polymer und das Kapillararray wichtig. Optimale

Ergebnisse lassen sich mit den folgenden Bedingungen für die Kapillarelektrophorese erziel.

1. *6,8 µl GS600v2 LIZ Größenstandard und 250 µl Hi-Di Formamid kombinieren und gründlich vermischen (Gemisch ausreichend für 16 Vertiefungen). Je 15 µl des Gemisches in die 96 Vertiefungen der optischen Mikrotiterplatte geben.*
2. *Je 3 µl amplifiziertes PCR-Produkt von Gemisch A und B in separate Vertiefungen geben, in denen sich bereits das Größenstandard/Formamid-Gemisch (aus Schritt 1) befindet.*
3. *Das in die PCR-Platte gefüllte PCR-Produkt auf einem Thermocycler mit folgenden Parametern denaturieren: 3 Minuten bei 94 °C in Verbindung mit 30 Sekunden bei 4 °C.*
4. *Die Mikrotiterplatte kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt am Boden der Röhrchen sammelt und Bläschen aus den Vertiefungen entfernt werden. Dann die Mikrotiterplatte in den Gen-Analysator laden.*

Hinweis: Die Einstellungen für die Probeninjektion können dabei je nach der in der PCR erzeugten Amplikonmenge, die von der eingesetzten Genom-DNA abhängt, geändert werden. Durch Reduktion der Injektionszeit bzw. -spannung kann der Säule weniger Amplikon zur Analyse zugeführt werden. Umgekehrt bedeutet eine längere Injektionszeit bzw. -spannung eine größere der Säule zugeführte Amplikonmenge. Zuvor amplifizierte Proben können zur erneuten Analyse mehrfach erneut injiziert werden. Weitere Informationen gehen aus dem Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Fehlersuche hervor.

ABI 3130 Geräte:

Es muss ein CF-EU2-Durchlaufmodul mit Protokoll erstellt werden, das dann für jeden CF-EU2-Durchlauf verwendet werden kann.

Das CF-EU2-Durchlaufmodul in der **Module Manager** *(Modulverwaltung) der 3130 Datenerfassungssoftware erstellen. Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:*

- *Type: Regular (Typ: Normal)*
- *Template (Vorlage): FragmentAnalysis36_POP7*
- *Die in der nachstehenden Tabelle beschriebenen Einstellungen eingeben:*

36-cm-Kapillarmodul

#	Bezeichnung des Parameters	Wert	Bereich
1	Oven Temperature (Ofentemperatur)	60	18…65 °C (ganzzahlig)
2	Poly_Fill_Vol. (Polymer-Füllvolumen)	6500	6500…38000 Schritte
3	Current Stability (Stromstabilität)	5,0	0…2000 uA (ganzzahlig)
4	PreRun_Voltage (Vorlaufspannung)	15,0	0…15 kV
5	Pre_Run_Time (Vorlaufzeit)	180	1…1000 s
6	Injection_Voltage (Injektionsspannung)	3,0	0…15 kV
7	Injection_Time (Injektionszeit)	12,0**	1…600 s
8	Voltage_Number_Of_Steps (Spannung – Anzahl der Schritte)	20	1…100 nk
9	Voltage_Step_Interval (Spannungsschrittintervall)	15	1…60 s
10	Data_Delay_Time (Datenverzögerungszeit)	60	1…3600 s
11	Run_Voltage (Durchlaufspannung)	15,0	0…15 kV
12	Run_Time (Durchlaufzeit)	1200	300…14000 s

****** Für die Analyse von aus Trockenblut extrahierter DNA die Injektionszeit auf 36 Sekunden erhöhen.

Hinweis: Der erforderliche Wert für „Run Time“ (Durchlaufzeit) kann je nach der Umgebungstemperatur am Aufstellort des Gen-Analysators verschieden sein Weitere Informationen zur Erstellung von Durchlaufmodulen gehen aus dem Benutzerhandbuch für den Gen-Analysator 3130 von Applied Biosystems hervor.

Das CF-EU2-Protokoll in der **Protocol Manager** *(Protokollverwaltung) erstellen. Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:*

- *Type: Regular (Typ: Normal)*
- *Run Module (Durchlaufmodul): CF-EU2 (siehe Durchlaufmodul oben)*
- *Dye Set (Farbstoffset): G5*

Für einen Durchlauf mit den Proben mit der **Plate Manager** *(Plattenverwaltung) ein Probenblatt erstellen und darauf achten, dass im Instrumentenprotokoll das richtige Protokoll für CF-EU2v1 ausgewählt wird (siehe oben).*

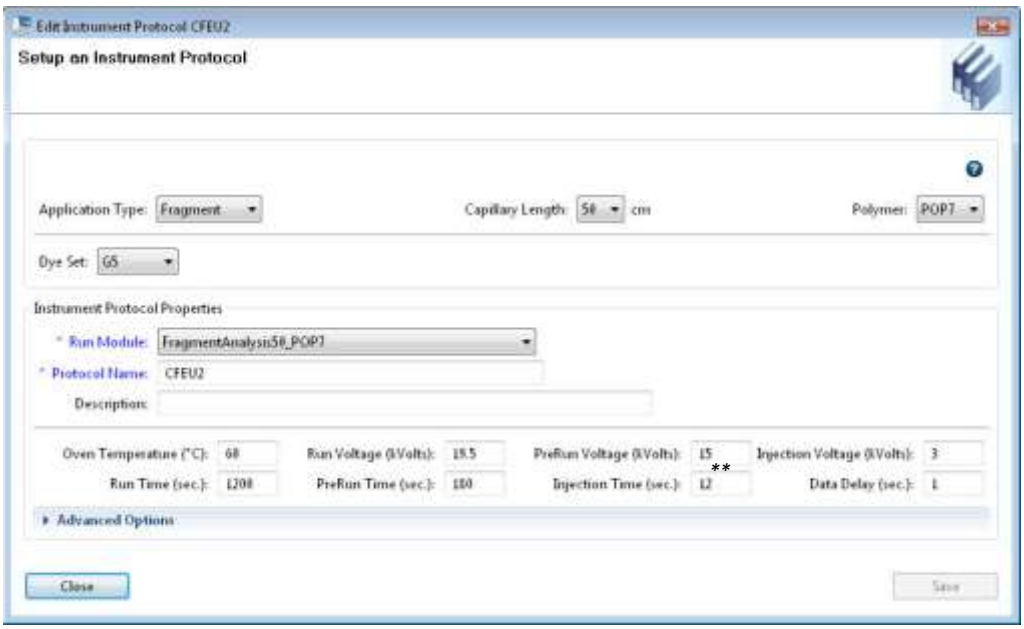
Hinweis: Weitere Informationen zu Einrichtung, Betrieb und Fehlersuche für das Instrument gehen aus dem Benutzerhandbuch für den Gen-Analysator 3130 von Applied Biosystems hervor.

ABI 3500 Geräte:

Es muss ein CF-EU2 **Instrument Protocol** *(Instrumentenprotokoll) erstellt werden, das dann für jeden CF-EU2v1-Durchlauf verwendet werden kann.*

Das CF-EU2 **Instrument Protocol** *(Instrumentenprotokoll) über die Instrumenten-protokoll-Bibliothek des 3500 erstellen. Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:*

- *Run Module (Durchlaufmodul): FragmentAnalysis50_POP7*
- *Die in der nachstehenden Abbildung beschriebenen Einstellungen eingeben:*



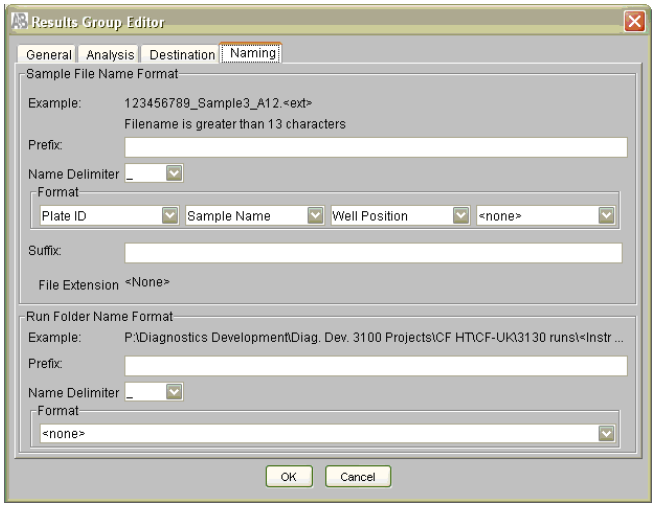
****** Für die Analyse von aus Trockenblut extrahierter DNA die Injektionszeit auf 36 Sekunden erhöhen.

*Für einen Durchlauf mit den Proben durch Klicken auf „***Create Plate from Template***“ (Platte nach Vorlage erstellen) unter „***Dashboard***“ eine Probenplatte erstellen und darauf achten, dass das richtige Instrumentenprotokoll für CF-EU2v1 ausgewähltwird (siehe oben).*

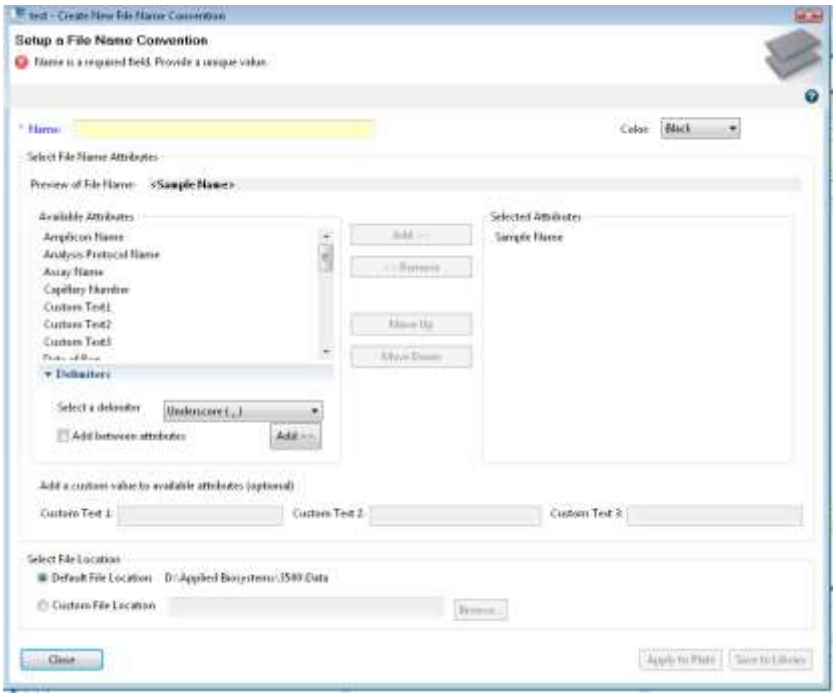
Einrichtung des Probenblattes für GeneMarker:

Mit der GeneMarker Software ist ein direkter Vergleich zwischen den A- und B-Daten derselben Person möglich. Dafür ist es wichtig, dass die Bezeichnung der Rohdaten-Ausgabedatei (fsa-Datei) für alle Proben und Gemische einheitlich ist. Das Probenblatt sollte den eindeutigen Probennamen für jede zu testende Probe mit dem Suffix _A bzw. _B enthalten, je nachdem, welches Gemisch getestet wird. Soll der fsa-Name die Platten-ID enthalten, sollte immer dasselbe Format verwendet werden, z. B. CFEU2 TTMMJJJJ.

Auf dem **3130** sollten die Parameter für „Results Destination“ (Ergebnisziel) so eingestellt sein, dass die Probenbezeichnung im fsa-Dateinamen enthalten ist, z. B. CFEU2 TTMMJJJJ**_1234,5_A_**A01.



Auf dem **3500** sollte die Dateinamenkonvention so eingestellt sein, dass die Probenbezeichnung im fsa-Dateinamen enthalten ist, z. B. CFEU2 TTMMJJJJ**_1234,5_A_**A01.



Interpretation der Ergebnisse

Bei der Datenerfassung werden die Peaks der PCR-Fragmente auf dem Rohdaten-Elektropherogramm in den Farben blau (Mutant) oder grün (Wildtyp) dargestellt. Ein Mensch besitzt zwei Kopien des CFTR-Gens. Besitzen diese Kopien an einer bestimmten Stelle die gleiche Sequenz, ist die Person an dieser Stelle homozygot. Unterscheiden sich die Sequenzen der Kopien an einer bestimmten Stelle, ist die Person an dieser Stelle heterozygot.

Nach Abschluss der Datenerfassung sollte die Größe der CF-EU2v1 PCR-Fragmente mithilfe der Fragmentanalysesoftware an den GS600v2 LIZ Größenstandard angepasst werden.

Das Dokument „Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Analysesoftware“ enthält eine ausführliche Anleitung zu Softwareeinstellungen, Analyse und Interpretation. Leitfäden zur Analysesoftware sind für die GeneMapper- und GeneMarker-Software auf der Elucigene Diagnostics-Webseite erhältlich:

www.elucigene.com/products

Die Ergebnisse des A-Gemisches (Mutationsgemisches) bestimmen, ob eine Person Träger einer Mutation ist, was durch einen blauen Peak angezeigt wird. Das Mutationsgemisch enthält auch Primer für das normale F508-Allel; daher kann mit diesem Gemisch bestimmt werden, ob eine Person normal für F508 (nur grüner Peak), homozygot für die Mutation F508del (nur blauer Peak) oder heterozygot für F508del (blauer und grüner Peak) ist.

Wird eine andere Mutation beobachtet, können die Ergebnisse des B-Gemischs (Wildtyp-Gemisch) analysiert werden, um den homozygoten oder heterozygoten Status zu bestimmen. Das Vorhandensein eines grünen Peaks für das spezielle Allel im Wildtyp-Gemisch bedeutet, dass die Person heterozygot ist, und das Fehlen des grünen Peaks zeigt an, dass die Person für die spezielle Mutation homozygot ist.

Hypervariable STR-Marker (rot) sind in beiden Gemischen enthalten. So können die mit dem Mutationsgemisch amplifizierte Probe und die mit dem Wildtyp-Gemisch amplifizierte Probe verglichen werden, um die Gefahr einer Probenverwechslung zu reduzieren; ein unterschiedliches STR-Profil in beiden Gemischen bedeutet eine Probenverwechslung. Das Fehlen dieser STR-Marker bedeutet eine fehlgeschlagene Probe. Das Vorhandensein der STR-Marker bei sehr niedrigen RFU bedeutet, dass es sich um eine schwache Probe handelt, die mit Vorsicht analysiert werden sollte.

Hinweis: Weitere Informationen gehen aus dem Leitfaden zur Fehlersuche hervor.

Nachgewiesene Marker

In der nachstehenden Tabelle sind die vom CF-EU2v1-Gemisch nachgewiesenen Marker zusammengefasst. Die Marker sind nach dem Größenbereich des dargestellten PCR-Produkts aufgeführt.

Nachgewiesene Marker

Marker (Peak-Nr.)	Marker	bp-Größenbereich des Produkts (3130/POP7-Daten)
01	R347H	110.5-116.5
02	R347P	117-123
03	2789+5G>A	124-130
04	3120+1G>A	132.5-138.5
05	711+1G>T	141.5-147.5
06	R334W	147.5-154
07	I507del	156-162.5
08	F508del	163-169
09	3849+10KbC>T	172-178
10	1677delTA	180-188.5
11	1078delT	193-199
12	V520F	206-211.5
13	L206W	215-220
14	W1282X	224.5-230.5
15	R560T	234.5-240.5
16	2347delG	242-246
17	Q890X	250-252
18	R553X	255.5-261.5
19	G551D	265-267
20	S549R(T>G)*	267.5-269.5
21	S549N	275-280
22	M1101K	282-288
23	G542X	289-295.5
24	3905insT	297-303.5
25	Y1092X(C>A)	308-314
26	S1251N	315-321
27	444delA	323-326
28	1811+1.6kbA>G	332-338
29	1717-1G>A	341.5-347.5
30	R117H	349-355
31	R117C	357-360
32	N1303K	360-366.5
33	Y122X	367-373
34	394delTT	377-383
35	G85E	384-390
36	R1066C	391-397
37	1898+1G>A	398.5-404.5
38	W846X	406-411
39	2184delA	413-418
40	D1152H	423-429
41	CFTRdel2,3	433-439
42	P67L	439.5-445.5
43	2143delT	446-450.5
44	E60X	453.5-460.5
45	3659delC	461-465.5
46	3272-26A>G	470-476
47	621+1G>T	485.5-491.5

Marker-Nr.	Marker	bp-Größenbereich des Produkts (3130/POP7-Daten)
48	A455E	496-503
49	R1162X	506-512
50	R1158X	516.5-524.5
5T**	IVS8-5T	110-130
7T	IVS8-7T	140-160
9T	IVS8-9T	175-195

***S549R(T>G)**

Peak 20 ist nur im A-Gemisch vorhanden.

**** 5T-Allel-Größenbereich**

Marker	bp-Größenbereich des Produkts (3130/POP7-Daten)
5T (9)	117.25 – 118.75
5T (10)	119.25 – 120.75
5T (11)	121.25 – 122.75
5T (12)	123.25 – 124.75
5T (13)	125.25 – 126.75

HINWEIS: Die Markergrößen können abhängig vom verwendeten Gerät und Polymer schwanken.

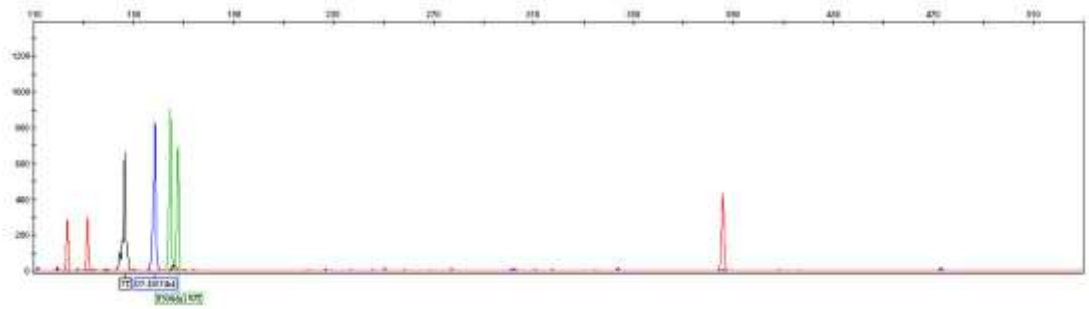
Interpretationsbeispiele

I507del

Aufgrund der Lage der I507del-Deletion im CFTR-Gen ist es möglich, das Vorhandensein dieses Markers über eine 3-bp-Verschiebung in der Größe des F508del-Peaks sowie über einen speziellen I507del-Mutationspeak nachzuweisen.

Wenn ein einzelnes mutiertes I507del-Allel vorhanden ist, wird der I507del-Mutationspeak als blauer Peak bei ca. 159 bp dargestellt. Ein Wildtyp-Peak für F508 ist zwar zu sehen, ist aber nur etwa halb so hoch wie ein normaler homozygoter Wildtyp-Genotyp; er erscheint als grüner Peak bei ca. 167 bp. Außerdem ist ein weiterer grüner Peak bei ca. 164 bp dargestellt.

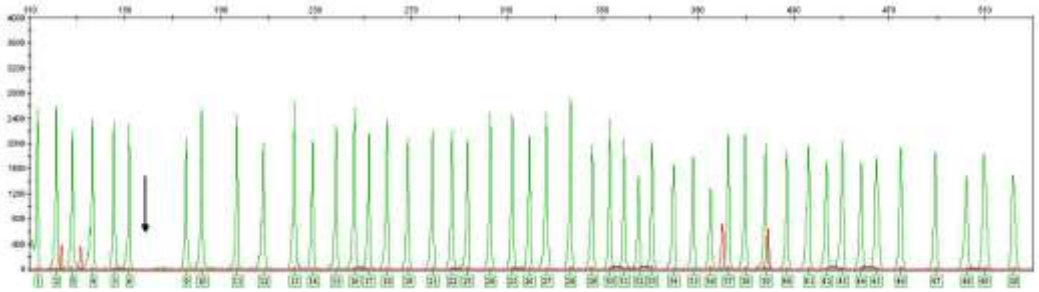
Heterozygote I507del-Probe



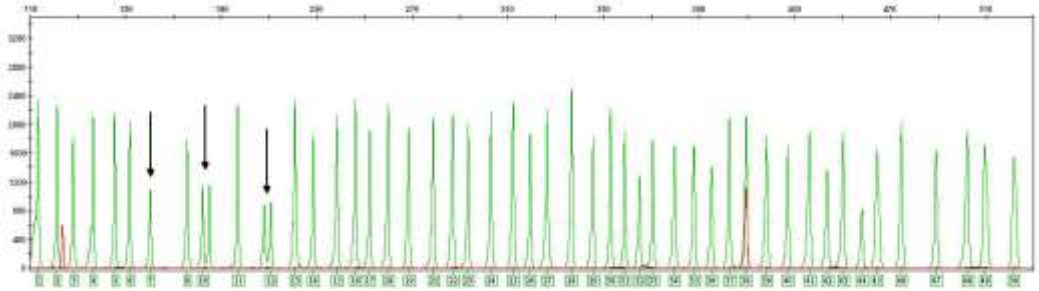
Eine I507del/F508del-Probe ergibt einen verschobenen grünen F508del-WT-Peak bei ca. 164 bp (3 bp weniger als normal), einen blauen F508del-M-Peak bei 166 bp und einen blauen I507del-M-Peak bei ca. 159 bp.

Eine I507del/I507del-Probe ergibt einen blauen Peak bei ca. 159 bp und einen einzelnen grünen Peak bei ca. 164 bp (3 bp kleiner als der normale F508-Peak, der beim Fehlen von I507del dargestellt wird).

F508del
Bei Vorliegen einer F508del-Mutation funktioniert der I507del-WT-Primer nicht. Daher hat eine Person, die für F508del homozygot ist, keinen I507del-WT-Peak im WT-Gemisch (siehe unten).



Ein I507del-WT-Peak mit geringerer Höhe und 2 Peaks im Abstand von 3 bp auf den Positionen 10 und 12 im WT-Gemisch (siehe unten) werden bei einer Person, die heterozygot für F508del ist, in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt.



Insertionen und Deletionen

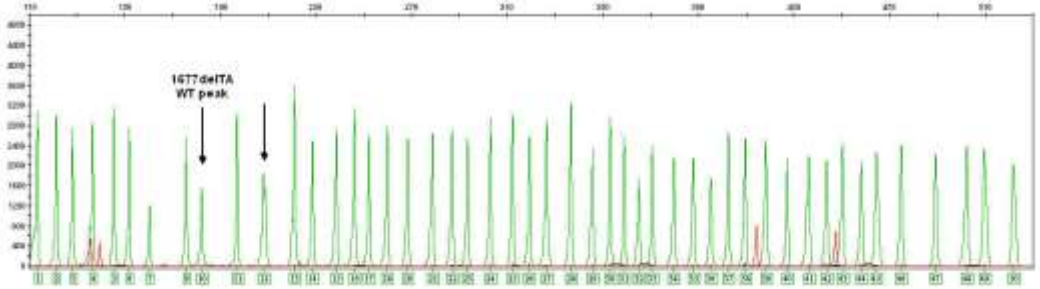
Aufgrund der Funktionsweise des CF-EU2v1 Kits führt das Vorhandensein von Insertionen bzw. Deletionen zwischen zwei entgegengesetzten Primern zu einer Größenänderung aller zwischen diesen beiden Primern erzeugten Amplikons. Daher können zusätzlich zu den 50 Mutationen, die das CF-EU2v1 Kit nachweist, eventuell vorhandene Insertionen bzw. Deletionen innerhalb der amplifizierten Zielsequenzen durch eine Änderung der erwarteten Amplikongröße im Wildtyp-Gemisch (B-Gemisch) nachgewiesen werden. Ein separates Dokument mit diesen Insertionen und Deletionen in Tabellenform ist auf der Elucigene Diagnostics-Webseite erhältlich:

www.elucigene.com/products

Beispiele für die durch das Kit nachgewiesenen Insertionen und Deletionen und ihre Auswirkungen auf das Profil des B-Gemisches sind nachstehend abgebildet.

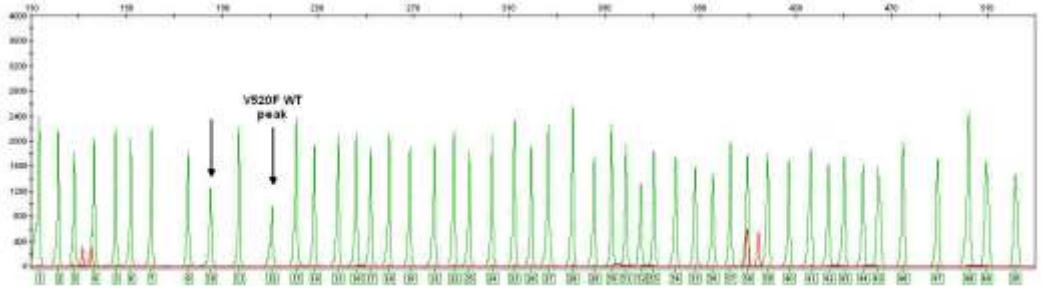
F508del/1677delTA

Bei einer Person, die heterozygot für die F508del/1677delTA-Mutationen ist, werden zwei Peaks im Abstand von 1 bp auf der Position 12 (V520F WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt.



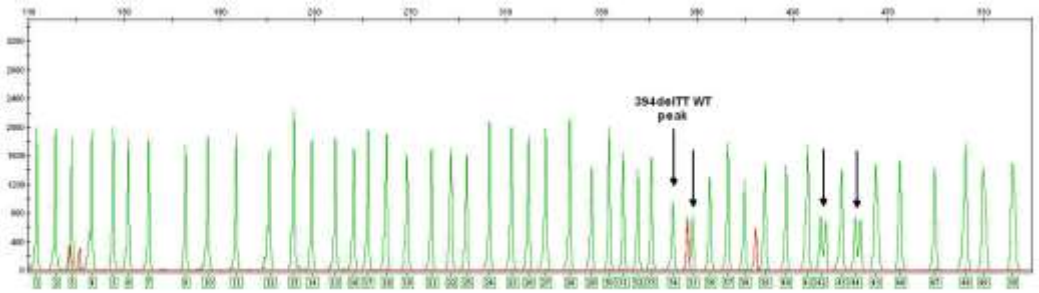
V520F

Bei einer Person, die heterozygot für die V520F-Mutation ist, wird ein Wildtyp-Peak mit geringerer Höhe auf Position 10 (1677delTA WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt, da dadurch der 1677delTA-WT-Primer nicht funktioniert. Die Peaks 10 und 12 fallen bei einer Person, die homozygot für die V520F-Mutation ist, aus den Ergebnissen heraus.



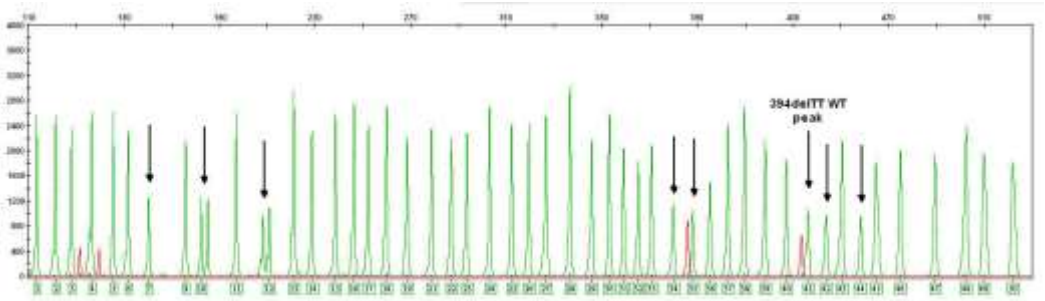
394delTT

Bei einer Person, die heterozygot für die 394delTT-Mutation ist, werden zwei Peaks im Abstand von 2 bp auf den Positionen 35 (G85E WT), 42 (P67L WT) und 44 (E60X WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die 394delTT-Mutation ist, fällt Peak 34 aus den Ergebnissen heraus und die Peaks 35, 42 und 44 werden auf der erwarteten Höhe, aber mit verschobener und um 2 bp kleinerer Größe als erwartet in den Ergebnissen dargestellt.



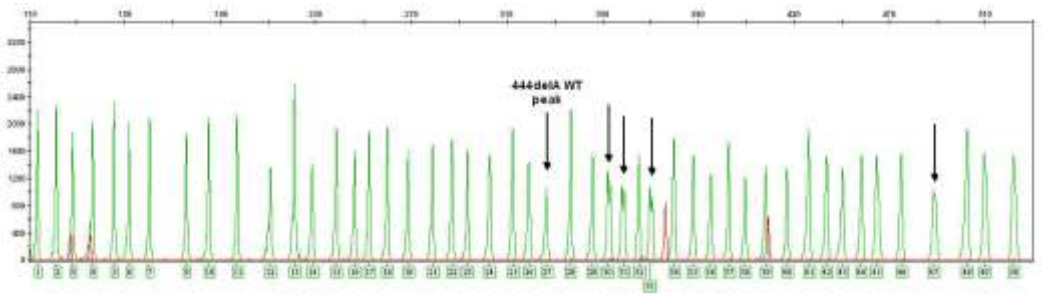
F508del/CFTRdele2,3

Bei einer Person, die heterozygot für die CFTRdele2,3-Mutation ist, werden geringere Peakhöhen auf den Positionen 34 (394delTT), 35 (G85E WT), 41 (CFTRdele2,3 WT), 42 (P67L WT) und 44 (E60X WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die CFTRdele2,3-Mutation ist, fallen die Peaks 34, 35, 41, 42 und 44 aus den Ergebnissen heraus.



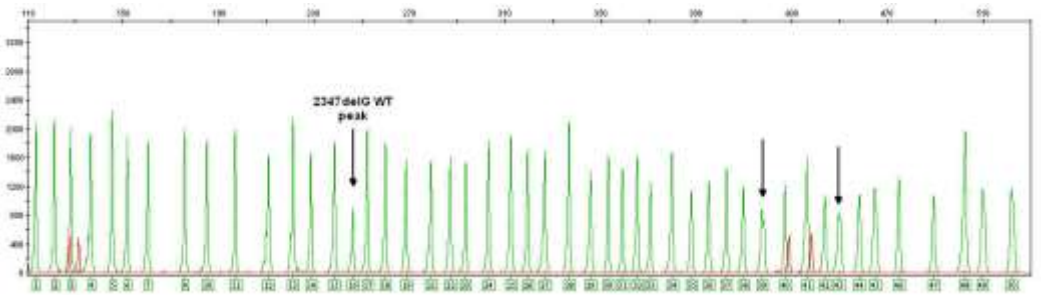
444delA

Bei einer Person, die heterozygot für die 444delA-Mutation ist, werden zwei Peaks im Abstand von 1 bp auf den Positionen 30 (R117H WT), 31 (R117C WT), 33 (Y122X WT) und 47 (621+1 WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die 444delA-Mutation ist, fällt Peak 27 aus den Ergebnissen heraus und die Peaks 30, 31, 33 und 47 werden auf der erwarteten Höhe, aber mit verschobener und um 1 bp kleinerer Größe als erwartet in den Ergebnissen dargestellt.



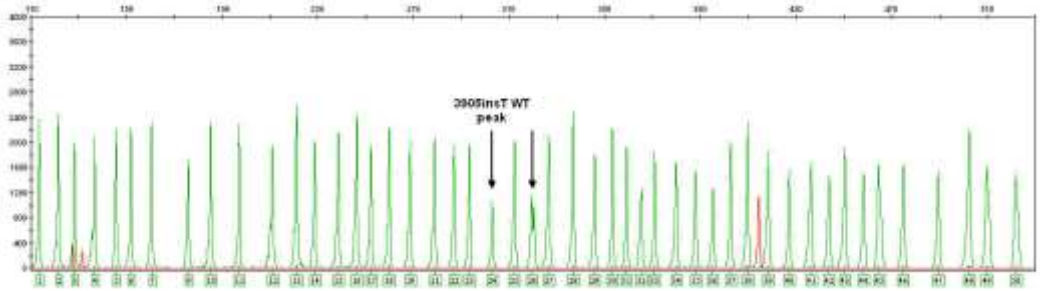
2347delG

Bei einer Person, die heterozygot für die 2347delG-Mutation ist, werden zwei Peaks im Abstand von 1 bp auf den Positionen 39 (2184delA WT) und 43 (2143delT WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die 2347delG-Mutation ist, fällt Peak 16 aus den Ergebnissen heraus und die Peaks 39 und 43 werden auf der erwarteten Höhe, aber mit verschobener und um 1 bp kleinerer Größe als erwartet in den Ergebnissen dargestellt.



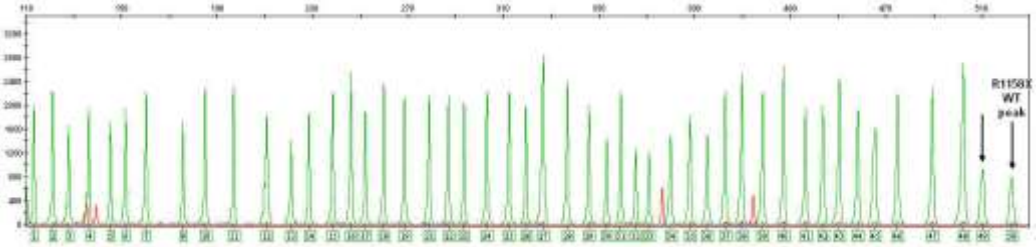
3905insT

Bei einer Person, die heterozygot für die 3905insT-Mutation ist, werden zwei Peaks im Abstand von 1 bp auf der Position 26 (S1251N WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die 3905insT-Mutation ist, fällt Peak 24 aus den Ergebnissen heraus und Peak 26 wird auf der erwarteten Höhe, aber mit verschobener und um 1 bp größerer Größe als erwartet in den Ergebnissen dargestellt.



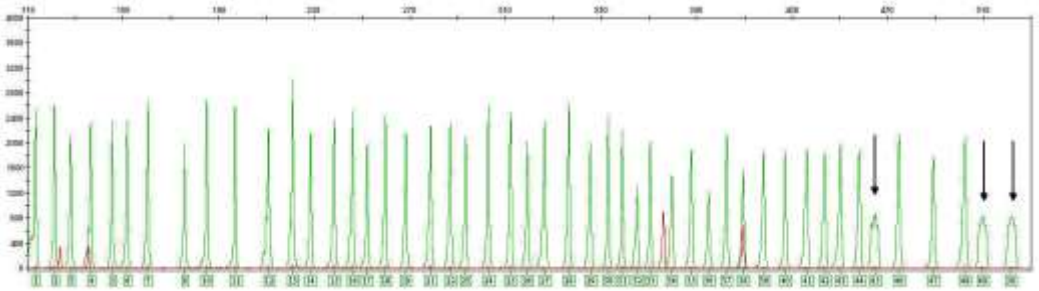
R1158X

Bei einer Person, die heterozygot für die R1158X-Mutation ist, werden reduzierte Peakhöhen bei Position 49 (R1162X WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für die R1158X-Mutation ist, fällt Peak 49 aus den Ergebnissen heraus.



Polymorphismus rs4148721 (delAT) in Intron 22

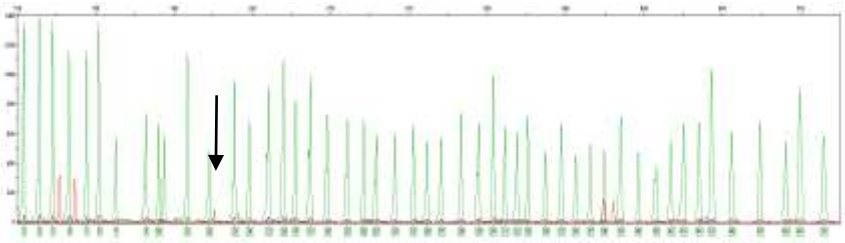
Bei einer Person, die heterozygot für den Polymorphismus rs4148721 (Deletion von AT) in Intron 22 ist, werden zwei Peaks im Abstand von 2 bp auf den Positionen 45 (3659delC WT), 49 (R1162X WT) und 50 (R1158X WT) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für den Polymorphismus rs4148721 ist, werden Peak 45, 49 und 50 auf der erwarteten Höhe, aber mit verschobener und um 2 bp kleinerer Größe als erwartet in den Ergebnissen dargestellt.



Weitere Beobachtungen

V520F – Polymorphismus 1584G>A in Exon 12

Der 1584G>A-Polymorphismus ist als Störfaktor für die Amplifikation der V520F-Sequenz (Mutation und Wildtyp) identifiziert worden. Bei einer Person, die heterozygot für den 1584G>A-Polymorphismus ist, werden reduzierte Peakhöhen bei Position 12 (V520F) in den Ergebnissen für das B-Gemisch dargestellt. Bei einer Person, die homozygot für den 1584G>A-Polymorphismus ist, fällt Peak 12 aus den Ergebnissen für das B-Gemisch heraus. Bei einer Person, die sowohl heterozygot für die F508del-Mutation als auch heterozygot für die 1584G>A-Mutation ist, erscheint nur ein einzelner Peak 12 im B-Gemisch anstelle der zu erwartenden zwei Peaks bei Position 12, die normalerweise bei für F508del heterozygoten Personen auftreten. Siehe nachstehendes Beispiel. Bei einer Person, die heterozygot für die V520F-Mutation und den 1584G>A-Polymorphismus auf dem gleichen Allel ist, fällt Peak 12 aus den Ergebnissen für das A-Gemisch heraus. Dieses Ergebnis wurde bisher nicht beobachtet und stellt wahrscheinlich eine seltene Kombination dar.



Kreuzreaktivität

Während der Testentwicklung wurden alle Anstrengungen unternommen, Interferenzen der Testfunktion durch andere im CFTR-Gen vorkommende berichtete Polymorphismen und Mutationen zu vermeiden.

Die seltene Mutation R1283M wurde auf Kreuzreaktivität untersucht und wurde nicht vom Elucigene CF-EU2v1 Kit nachgewiesen. Außerdem wurden die folgenden Polymorphismen vom Test nicht nachgewiesen: 1655T/G (F508C), 1651A/G.

Die Beurteilung bekannter Mutationen und Polymorphismen im CFTR-Gen hat folgende Effekte auf Ergebnisse mit dem Elucigene CF-EU2v1 Kit herausgestellt:

1. Der Primer für die G551D-Mutation im A-Gemisch weist auch die S549RT>G-Mutation nach. Die Analysesoftware kennzeichnet diese als Peak 20. Einen zugehörigen Wildtyp-Peak gibt es im B-Gemisch nicht.
2. Der Primer für die 2184delA-Mutation im A-Gemisch kreuzreagiert mit mutierter 2183AA>G-DNA-Sequenz und führt zu einem Mutationspeak auf der 2184delA-Position.
3. Der Primer für die 1078delT-Mutation im A-Gemisch kreuzreagiert mit mutierter F316L-DNA-Sequenz und führt zu einem Mutationspeak auf der 1078delT-Position.
4. Der Primer für die R347P-Mutation im A-Gemisch kreuzreagiert mit mutierter R347H-DNA-Sequenz und führt zu einem Mutationspeak auf der R347P-Position mit geringerer Höhe im Vergleich zum echten R347P-Peak.
5. Das Vorhandensein des F508C-Polymorphismus (1655T>G) führt zu einer Verringerung der Höhe des I507del-Peaks im CF-EU2v1 B-Gemisch.
6. Das Vorhandensein von R117H führt zu einer Verringerung der Höhe des R117C-Peaks im CF-EU2v1 B-Gemisch. In einer für R117H homozygoten Probe fehlt der R117C-Peak.
7. Das Vorhandensein von G85E führt zu einer Verringerung der Höhe des 394delTT-Peaks im CF-EU2v1 B-Gemisch. In einer für G85E homozygoten Probe fehlt der 394delTT-Peak.
8. Bei einer für F508del heterozygoten Probe und insbesondere bei einer für F508del homozygoten Probe kann in den Ergebnissen bisweilen ein sehr kleiner Artefaktpeak auf der I507del-Position beobachtet werden.
9. Die folgenden Mutationen wurden aufgrund mangelnder Verfügbarkeit entsprechender Proben nicht auf eine mögliche Kreuzreaktivität getestet und können Interferenzen der Testfunktion verursachen: R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V und die seltene Kombination aus I507del mit dem Polymorphismus 1651A/G.

Leistungsmerkmale

Einhundertzehn DNA-Proben aus flüssigem Vollblut (EDTA) wurden mit Elucigene CF-EU2v1 blind getestet. Fünf Proben schlugen nach der PCR aufgrund einer zu geringen DNA-Konzentration (unter 1,5 ng/µl) fehl. Von den Proben mit interpretierbaren Ergebnissen waren 96 normal, 5 heterozygot für F508del, 1 heterozygot für 1717-1G>A, 1 heterozygot für G551D, 1 heterozygot für 621+1G>T, 1 heterozygot für G542X und 1 compound-heterozygot für G542X/F508del.

Einundneunzig DNA-Proben aus Trockenblut wurden mit Elucigene CF-EU2v1 blind getestet. Bei fünf Proben schlug die Amplifikation fehl. Von den Proben, bei denen die Amplifikation erfolgreich war, erfüllten 20 Proben nach einer 12-sekündigen Injektion in einen Gen-Analysator Modell 3500 die Analysekriterien für die Interpretation nicht; alle fehlgeschlagenen Proben korrelierten mit DNA niedriger Konzentration (weniger als 1,5 ng/µl). Die 20 fehlgeschlagenen Proben wurden 36 Sekunden lang erneut in einen Gen-Analysator Modell 3500 injiziert und analysiert. Von diesen Proben erfüllten 7 die Analysekriterien für die Interpretation nicht. Von den 79 Proben mit auswertbaren Ergebnissen waren 38 normal, 5 heterozygot für F508del, 3 heterozygot für G551D, 3 heterozygot für W1282X, 2 heterozygot für D1152H und 2 heterozygot für G542X.

Außerdem wurden vier compound-heterozygote Ergebnisse (3120+1G>A/F508del, R117H/F508del, R1162X/F508del und R553X/F508del) ermittelt. Darüber hinaus traten die folgenden heterozygoten Proben jeweils einmal auf: E60X, G85E, 394delTT, Y122X, 621+1G>T, 1078delT, R334W, R347P, A455E, I507del, 1717-1G>A, R553X, 1811+1.6kbA>G, 1898+1G>A, 2184delA, W846X, 3272-26A>G, Y1092X, 3659delC, 3849+10kbC>T, S1251N und N1303K.

Sechsundvierzig DNA-Proben, unter denen alle 50 Mutationen vertreten waren, die das CF-EU2v1 Kit nachweist, wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten amplifiziert. Alle Proben erzielten die erwarteten Ergebnisse ohne falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse, was eine klinische Spezifität und Sensitivität von 100% bedeutet.

Fehlersuche

Diese Gebrauchsanweisung wird bereitgestellt, um die optimale Leistungsfähigkeit des Assays zu gewährleisten. Anwender müssen sich an die beschriebenen Vorgehensweisen halten. Jegliche Abweichung davon kann zu einer suboptimalen Leistung und zu Daten von schlechter Qualität führen. Auf Anfrage ist ein Leitfaden zur Fehlersuche von Elucigene Diagnostics erhältlich. Darin finden sich Beispiele und Lösungen für einige der häufigsten Beobachtungen beim Elucigene CF-EU2v1 Kit, u. a.:

- Keine diagnostischen oder STR-Peaks
- Schwache diagnostische oder STR-Peaks
- Zu starke Durchbruch-/Hintergrundpeaks
- Nicht markierte Peaks
- Schwache FAM-Peaks (Mutationspeaks)
- Unausgewogenes Profil des A-Gemisches
- Unausgewogenes Profil des B-Gemisches
- Unterteilte Peaks im Profil des B-Gemisches

Exemplare des Elucigene CF-EU2v1 Leitfadens zur Fehlersuche können von unserem Technischen Kundendienst bezogen werden:
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

Grenzen des Verfahrens

1. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse sind, ebenso wie die aller anderen diagnostischen Tests, stets im Kontext des klinischen Allgemeinbildes zu verwenden und auszuwerten. Elucigene Diagnostics übernimmt keine Verantwortung für klinische Entscheidungen.
2. Das Fehlen einer von diesem Kit erfassten Mutation schließt andere Mutationen des CFTR-Gens nicht aus. Andere Mutationen, die dieses Kit nicht nachweisen kann, sind möglich.
3. Mutationen treten je nach Population in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Daten über die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen in einer Population sind beim Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium erhältlich (6).

Der Anwender dieses Kits sollte bei der Meldung von Ergebnissen an den diagnostizierenden Arzt/Genetiker ausdrücklich auf diese Punkte hinweise.

Haftungsausschluss

Die Ergebnisse dieses Tests sowie anderer diagnostischer Assays sind zusammen mit anderen dem Arzt vorliegenden Labordaten und klinischen Befunden auszuwerten.

Diese Elucigene Reagenzien werden für Testzwecke im Rahmen der In-vitro-Diagnostik geliefert.

Weitere Einzelheiten zur Dateninterpretation finden sich im Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Analysesoftware:

www.elucigene.com/products

Literaturangaben

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589–95.

2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*. 1997;101:208–11

3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443–53

4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:816–21

5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. „Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. “ *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8

6. Cystic Fibrosis Mutation Database, *www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app*

7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. Am J Hum Genet. 2004; 74(1): 176–179.

8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucleic Acid Res 17: 2503-2516 (1989).

9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509-1510 (1994).

10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd edition. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Section 1

ELUCIGENE is a trademark of Delta Diagnostics (UK) Ltd.

ARMS ist eine Marke von AstraZeneca UK Ltd. QIAAMP ist eine Marke der Qiagen GmbH. PICOGREEN ist eine Marke von Molecular Probes Inc. GENEMARKER ist eine Marke der SoftGenetics Corporation. GENEMAPPER, NED, VIC, PET, POP-7, LIZ und HI-DI sind Marken der Life Technologies Corporation.

HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: BEGRENZTE LIZENZ
Mit den Farbstoffen VIC, NED und PET markierte Polynukleotide und/oder ihre Anwendung unterliegen eventuell einem oder mehreren Patenten im Besitz von Life Technologies Corp. Im Kaufpreis für dieses Produkt sind begrenzte, nicht übertragbare Rechte aufgrund bestimmter Ansprüche in bestimmten Patenten im Besitz von Life Technologies Corp. enthalten, die die Anwendung nur der betreffenden Produktmenge und ausschließlich zum Zwecke des Target-Nachweises in der Humanmedizin durch den

Käufer gestatten. Darüber hinaus werden keine weiteren Rechte gewährt. Weitere Informationen zum Erwerb von Lizenzen bezüglich der oben erwähnten Farbstoffe erteilt der Director of Licensing, outlicensing@lifetech.com.

Copyright © 2014 Delta Diagnostics (UK) Ltd.